

论著·基础研究

原花青素 B2 对人牙周膜细胞炎症介质表达的影响

顾丽芬¹, 杨涛², 高颖³, 周薇¹, 宋忠臣¹

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院牙周病科, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011; 2. 中国人民解放军 93313 部队, 长春 130111; 3. 中国人民解放军第 208 医院 461 临床部, 长春 130021

[摘要] **目的**·观察原花青素 B2 对牙龈卟啉单胞菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, hPDLs) 炎症介质表达的影响。**方法**·组织块法体外培养 hPDLs; 噻唑蓝比色法观察原花青素 B2 对 hPDLs 活性的影响; 原花青素 B2 预处理 hPDLs 1 h 后, 予以 LPS, 实时荧光定量 PCR 和 ELISA 检测炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6 及 IL-8 的 mRNA 和蛋白的表达; 荧光显微镜下观察细胞内活性氧的变化; Griess 法检测培养上清液中一氧化氮 (NO) 的水平。**结果**·当原花青素 B2 浓度达到 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 时可增强 hPDLs 的活性。原花青素 B2 可抑制 LPS 诱导的 IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 的 mRNA 和蛋白的表达, 降低活性氧和 NO 的水平。**结论**·原花青素 B2 可抑制牙龈卟啉单胞菌 LPS 诱导的 hPDLs 炎症介质的表达, 发挥一定的抗炎作用。

[关键词] 牙周膜细胞; 原花青素 B2; 脂多糖; 炎症介质

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.02.003 **[中图分类号]** R780.2 **[文献标志码]** A

Effect of procyanidin B2 on inflammatory mediators of human periodontal ligament cells

GU Li-fen¹, YANG Tao², GAO Ying³, ZHOU Wei¹, SONG Zhong-chen¹

1. Department of Periodontology, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. The 93313 Army of the Chinese People's Liberation Army, Changchun 130111, China; 3. The 461 Clinical Department of the 208 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Changchun 130021, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effects of procyanidin B2 on the expression of inflammatory mediators in human periodontal ligament cells (hPDLs) induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS). **Methods**·hPDLs were cultured using tissue explant method *in vitro*. The effect of procyanidin B2 on the cell viability of hPDLs was detected by MTT assay. hPDLs were stimulated by *P. gingivalis* LPS after treatment with procyanidin B2 for 1 h. The expressions of IL-1 β , IL-6, and IL-8 mRNA and proteins were detected by real-time PCR and ELISA assay. Reactive oxygen species (ROS) in the cytoplasm was observed under fluorescence microscope. Nitric oxide (NO) in the supernatant was detected by Griess assay. **Results**·100.00 $\mu\text{g/mL}$ procyanidin B2 could enhance the cell viability of hPDLs. Procyanidin B2 could inhibit the expressions of IL-1 β , IL-6, and IL-8 mRNA and proteins in hPDLs. It could also downregulate ROS and NO in hPDLs induced by *P. gingivalis* LPS. **Conclusion**·Procyanidin B2 can play an anti-inflammatory role by inhibiting inflammatory mediators in hPDLs induced by *P. gingivalis* LPS.

[Key words] periodontal ligament cell; procyanidin B2; lipopolysaccharide; inflammatory mediator

牙周炎是发生在牙周支持组织的慢性感染性疾病, 能导致牙周膜、牙槽骨等丧失, 最终造成牙齿松动脱落^[1]。牙菌斑微生物是牙周炎的始动因子。牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 在牙周病灶中检出率很高, 与牙周炎的发生发展密切相关^[2]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是牙龈卟啉单胞菌细胞壁外膜的主要成分, 是一种重要的毒力因子。牙龈卟啉单胞菌 LPS 可以刺激牙周组织细胞产生多种炎症介质参与免疫反应^[3], 它们的过度产

生是导致牙周炎发展的重要因素。最常用的牙周非手术治疗主要依赖于牙周洁治和刮治; 为达到较好的治疗效果, 会根据患者的全身状况和牙周炎症程度适当给予局部或者全身用药以减轻症状。现在临床上使用的药物大多是抗菌类药物, 这类药物治疗效果可靠, 但因其不良反应和细菌耐药性, 不建议长期使用。而许多多酚类植物成分具有抗菌、抗炎及抗氧化的功效, 在多种疾病包括牙周病领域均有相关报道^[4]。

[基金项目] 国家重点研发计划 (2017YFC0840100, 2017YFC0840110) (National Key R&D Program of China, 2017YFC0840100, 2017YFC0840110)。

[作者简介] 顾丽芬 (1980—), 女, 主治医师, 硕士生; 电子信箱: 906731251@qq.com。

[通信作者] 宋忠臣, 电子信箱: szhongchen@sina.com。

原花青素 (proanthocyanidins) 也被称为缩合单宁酸, 是从植物中提取的一种黄酮类多酚, 多由儿茶素或表儿茶素缩合而成^[5]。葡萄、可可、苹果、蓝莓等以及由它们酿造的酒或制作的果酱中都含有丰富的原花青素。原花青素 B2 (procyanidin B2) 是由 2 个单体儿茶素或表儿茶素 C4 与 C8 键合而成, 具有很强的生物活性^[6]。研究发现原花青素 B2 是一种强效抗氧化剂^[7], 具有抗炎^[8]、抗肿瘤^[9]和保护心血管系统^[10]等作用。

原花青素 B2 对巨噬细胞的抗炎作用已有相关报道^[8], 并被发现具有抵抗牙龈卟啉单胞菌的黏附作用^[11]; 但原花青素 B2 对牙周组织细胞的免疫反应未见相关报道。因此, 本研究通过观察原花青素 B2 对体外培养的人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, hPDLs) 活性的影响, 以及在牙龈卟啉单胞菌 LPS 刺激作用下对 hPDLs 表达炎症介质的影响, 初步探讨原花青素 B2 的抗炎作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

原花青素 B2 (普瑞法, 中国), DMEM 培养基 (Hyclone, 美国), 胎牛血清 (Gibco, 美国), 角蛋白抗体、波形丝蛋白抗体 (中杉金桥, 中国), 免疫组织化学 (简称免疫组化) 试剂盒 (迈新, 中国), 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒、DMSO (Sigma, 美国), 牙龈卟啉单胞菌 LPS (以下简称 LPS) (InvivoGen, 美国), 总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、RNA 反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (宝生物, 中国), ELISA 试剂盒 (欣博盛, 中国), 总一氧化氮 (NO) 检测试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (碧云天, 中国)。酶标仪 (Bio-Tek, 美国), 实时荧光定量系统 (Roche, 瑞士), 荧光显微镜 (Leica, 德国)。

1.2 hPDLs 培养及鉴定

取 14 ~ 25 岁健康前磨牙或智齿 (上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔外科门诊提供), 在超净工作台内用 PBS 反复冲洗, 刮取牙根中部 1/3 的牙周膜组织, 根据组织块法进行原代培养。待细胞密集, 去盖玻片, 消化后在原皿内传代。待细胞密度达 80%, 常规传代。采用免疫组化 SP 法对第 3 代 hPDLs 进行波形丝蛋白和角蛋白的鉴定。

1.3 原花青素 B2 对 hPDLs 细胞活性的影响

取第 4 ~ 6 代对数生长期的 hPDLs, 按 1.2×10^4 /孔

接种于 96 孔板。培养 24 h 后换液, 按实验分组分别加入浓度为 0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 的培养液, 每组 4 个复孔, 另设调零孔。分别在给药 24、48、72 h 后, 取出一块培养板, 弃上清液, PBS 清洗 1 次, 加入 200 μL 0.5 mg/mL MTT 工作液, 孵育 4 h, 弃上清液再加入 150 μL DMSO, 酶标仪中震荡 10 min, 检测波长 490 nm 处吸光度值 [$D(490 \text{ nm})$]。

1.4 原花青素 B2 对 LPS 作用后细胞因子表达的影响

1.4.1 基因检测 将第 4 ~ 6 代 hPDLs 按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 6 孔板内, 待细胞密度达 80% 时, 弃上清液, 按分组加入无血清培养液。阴性对照组不加任何刺激; LPS 组加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS; B2+LPS 组先分别用 25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 预刺激 hPDLs 1 h 后, 再加入 LPS。LPS 刺激时间为 4 h。

RNAiso Plus 裂解细胞, 提取细胞总 RNA, 反转录获得 cDNA, 加入引物以及 SYBR 酶, 在实时荧光定量系统内进行基因扩增。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences of real-time PCR

基因	引物序列
<i>GAPDH</i> ^①	F: 5'-CGGGAACTGTGGCGTGAT-3' R: 5'-GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAG-3'
<i>IL-1β</i> ^②	F: 5'-CTGGACCTCTGCCCTCTGG-3' R: 5'-TCCATGGCCACAACAACCTGA-3'
<i>IL-6</i> ^③	F: 5'-ACAGCCACTCACCTCTTCAG-3' R: 5'-CCATCTTTTTCAGCCATCTTT-3'
<i>IL-8</i> ^④	F: 5'-ACTCCAACCTTTCCACC-3' R: 5'-CTTCTCCACAACCTCTG-3'

注: ①甘油醛-3-磷酸脱氢酶; ②白细胞介素 1 β ; ③白细胞介素 6; ④白细胞介素 8。

1.4.2 蛋白检测 将第 4 ~ 6 代 hPDLs 按 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 24 孔板内, 待细胞密度达 80% 时, 弃上清液, 按分组加入 2% 血清培养液, 分组同 1.4.1。LPS 刺激 24 h 和 48 h 后, 分别收集培养上清液。按 ELISA 试剂盒说明进行操作, 检测波长 450 nm 处吸光度值 [$D(450 \text{ nm})$]。计算 IL-1 β 、IL-6、IL-8 蛋白的浓度。根据实验结果, 选择最佳原花青素 B2 浓度用于后续实验。

1.5 原花青素 B2 对 LPS 作用下 ROS 产生的影响

细胞种板同 1.4.2。阴性对照组不加任何刺激; LPS 组加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS; B2+LPS 组先用 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青

素 B2 预刺激 hPDLCs 1 h 后, 加入 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS。LPS 刺激时间为 48 h。收集上清液, 拟行细胞分泌总 NO 的检测; 培养板细胞孔用 PBS 清洗 1 次, 拟行 ROS 检测。

1.5.1 ROS 检测 按 ROS 检测试剂盒要求, 细胞孔内加入 DCFH-DA 荧光探针工作液, 培养箱内孵育 20 min 后, PBS 洗净细胞外荧光探针, 置于荧光显微镜下观察各组细胞荧光图像并照相。

1.5.2 NO 检测 96 孔板内加入 NaNO_2 标准品以及细胞上清液, 按总 NO 检测试剂盒说明操作, 检测 $D(540\text{ nm})$ 值; 计算总 NO 的浓度。

1.6 统计学分析

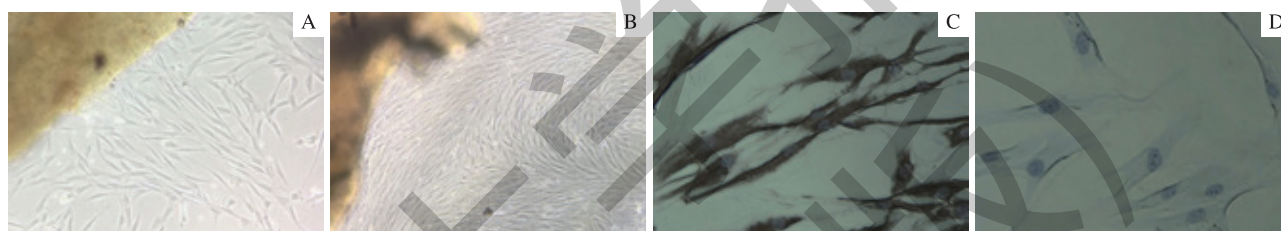
采用 Graphpad Prism 6 软件对实验数据进行统计学分析, 所有定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析进行

数据统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hPDLCs 的培养及鉴定

显微镜下观察: 组织块法培养 5 ~ 7 d, 细胞从组织块一侧呈放射状游出 (图 1A), 细胞为长梭形或纺锤形, 胞突细长, 胞质丰富, 细胞核为卵圆形; 接种约 14 d 后, 近组织块细胞密集, 呈旋涡状排列 (图 1B); 传代后细胞生长状态良好。使用免疫组化 SP 法对第 3 代培养细胞进行染色后镜下观察: 波形丝蛋白染色, 细胞质呈棕黄色, 为阳性表达 (图 1C); 角蛋白染色呈阴性 (图 1D)。结果提示, 培养细胞来源于中胚层间充质。



注: A. 细胞从组织块游出 ($\times 100$); B. 接种 14 d, 细胞呈旋涡状排列 ($\times 100$); C. 波形丝蛋白染色阳性 (SP 法, $\times 400$); D. 角蛋白染色阴性 (SP 法, $\times 400$)。

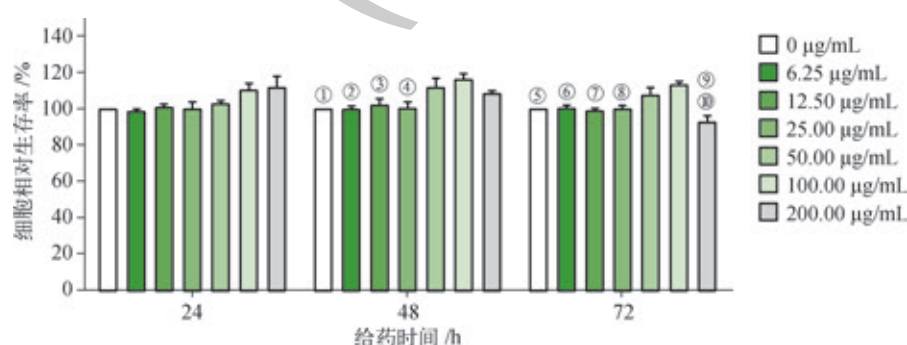
图 1 hPDLCs 的培养及鉴定

Fig 1 Culture and identification of hPDLCs

2.2 不同浓度原花青素 B2 对细胞活性的影响

6.25 ~ 200.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围的原花青素 B2 作用于 hPDLCs 24 h, 对细胞活性无明显影响 (均 $P > 0.05$)。给药 48 h 后, 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞的相对生存率为 $(116.3 \pm 4.5)\%$, 显著高于 0、6.25、12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞 (均 $P < 0.05$), 其余组间无明显差异。给药 72 h 后, 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 组的相对生存率为 $(113.2 \pm 1.2)\%$,

亦显著高于 0、6.25、12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞 (均 $P < 0.05$); 而 200.00 $\mu\text{g/mL}$ 组的相对生存率降至 $(91.9 \pm 3.8)\%$, 显著低于 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 组 (均 $P < 0.01$) (图 2)。实验表明, 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 作用 2 ~ 3 d 时, 可增强 hPDLCs 的活性, 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 效果最显著。



注: ^① $P=0.028$, ^② $P=0.023$, ^③ $P=0.045$, ^④ $P=0.026$, ^⑤ $P=0.022$, ^⑥ $P=0.025$, ^⑦ $P=0.011$, ^⑧ $P=0.019$, ^⑨ $P=0.000$, 与 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 比较; ^⑩ $P=0.008$, 与 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 比较。

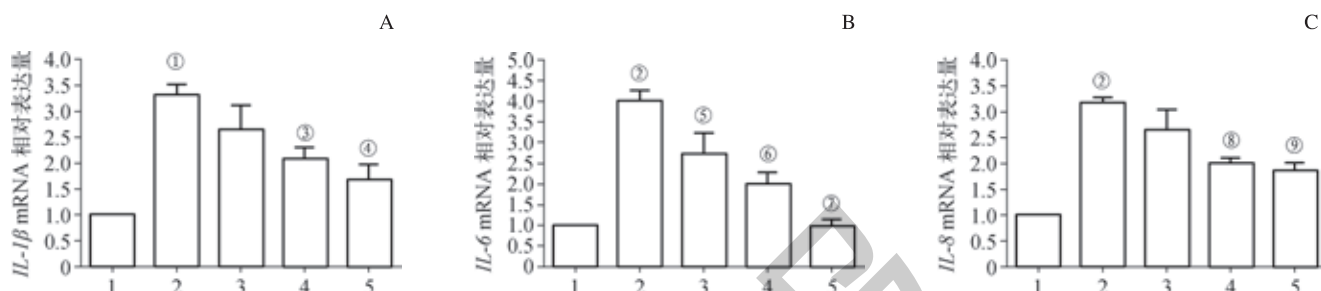
图 2 原花青素 B2 对 hPDLCs 细胞活性的影响

Fig 2 Effect of procyanidin B2 on the cell viability of hPDLCs

2.3 原花青素 B2 对 LPS 诱导细胞因子 mRNA 表达的影响

与阴性对照组比较, LPS 可显著上调 hPDLCs *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8* mRNA 的表达 (均 $P<0.01$); 采用原花青素 B2 预处理 hPDLCs 1 h, 再用 LPS 刺激细胞, 3 种细胞因子

的 mRNA 表达与 LPS 组相比均呈不同程度的下降。对于 *IL-1 β* 、*IL-8* mRNA, 原花青素 B2 从 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度起可下调其表达 (均 $P<0.05$); 对于 *IL-6* mRNA, 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 即能抑制其表达 ($P=0.039$) (图 3)。



注: A. *IL-1 β* mRNA 相对表达量; B. *IL-6* mRNA 相对表达量; C. *IL-8* mRNA 相对表达量。1 为阴性对照组, 2 为 LPS 组, 3 ~ 5 为 B2+LPS 组 (3、4、5 的原花青素 B2 浓度分别为 25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/mL}$)。① $P=0.001$, ② $P=0.000$, 与阴性对照组比较; ③ $P=0.031$, ④ $P=0.008$, ⑤ $P=0.039$, ⑥ $P=0.003$, ⑦ $P=0.000$, ⑧ $P=0.012$, ⑨ $P=0.006$, 与 LPS 组比较。

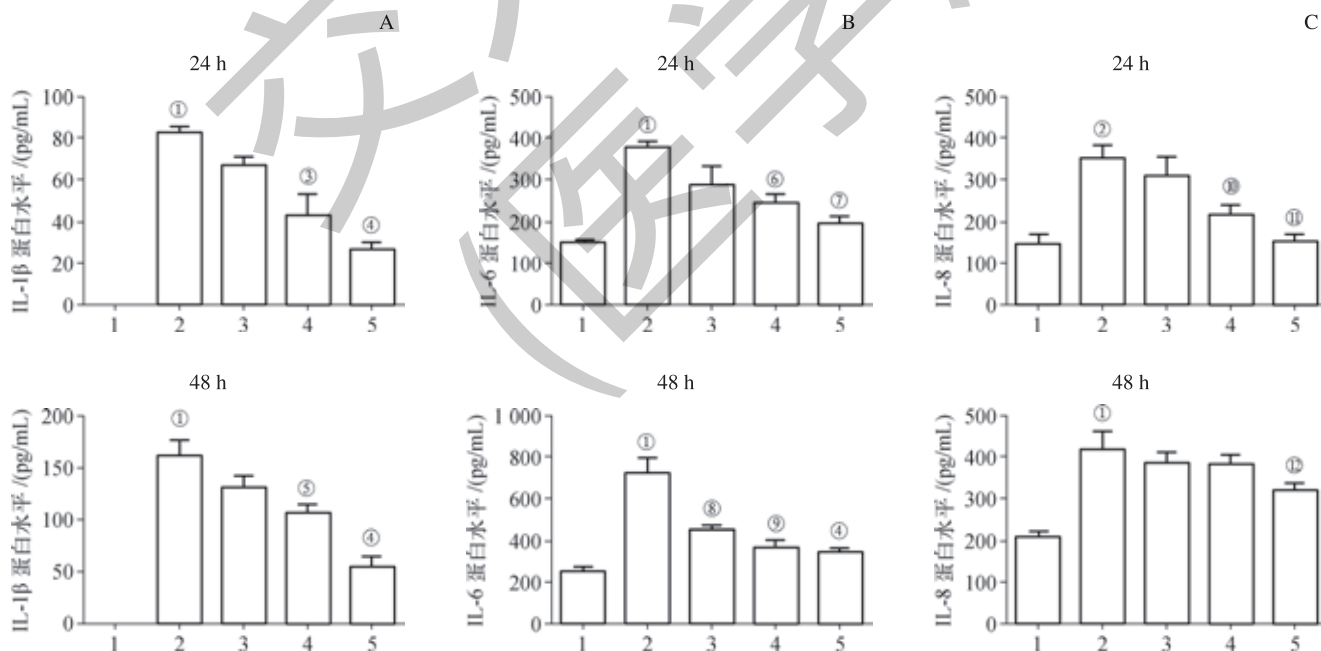
图 3 原花青素 B2 对 LPS 诱导 hPDLCs 细胞因子 mRNA 表达的影响

Fig 3 Effect of procyanidin B2 on cytokines mRNA expression of hPDLCs induced by LPS

2.4 原花青素 B2 对 LPS 诱导细胞因子蛋白表达的影响

与阴性对照组相比, 经 LPS 刺激 hPDLCs 24 h 和 48 h, 培养上清液中的 3 种蛋白表达量呈不同程度升高 (均 $P<0.01$)。原花青素 B2 预处理 hPDLCs 1 h 后, 再用 LPS 刺激 hPDLCs。在 24 h 时间点, 原花青素 B2 从

50.00 $\mu\text{g/mL}$ 开始下调 3 种蛋白表达量 ($P<0.05$)。在 48 h 时间点, 对于 *IL-1 β* , 原花青素 B2 从 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 开始降低其表达 ($P=0.032$); 对于 *IL-6*, 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 即明显降低其分泌 ($P=0.005$); 对于 *IL-8*, 只有 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 能明显降低其蛋白表达 ($P=0.012$) (图 4)。



注: A. *IL-1 β* (LPS 分别作用 24 h 和 48 h); B. *IL-6* (LPS 分别作用 24 h 和 48 h); C. *IL-8* (LPS 分别作用 24 h 和 48 h)。1 为阴性对照组, 2 为 LPS 组, 3 ~ 5 为 B2+LPS 组 (3、4、5 的原花青素 B2 浓度分别为 25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/mL}$)。① $P=0.000$, ② $P=0.005$, 与阴性对照组比较; ③ $P=0.003$, ④ $P=0.000$, ⑤ $P=0.032$, ⑥ $P=0.041$, ⑦ $P=0.008$, ⑧ $P=0.005$, ⑨ $P=0.001$, ⑩ $P=0.047$, ⑪ $P=0.007$, ⑫ $P=0.012$, 与 LPS 组比较。

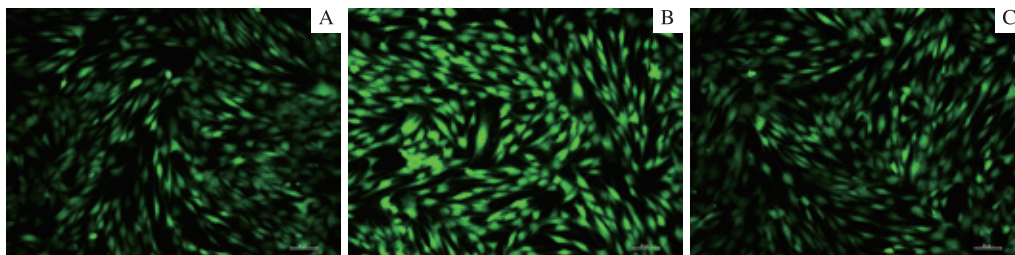
图 4 原花青素 B2 对 LPS 诱导 hPDLCs 细胞因子蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of procyanidin B2 on cytokines protein expressions of hPDLCs induced by LPS

2.5 原花青素 B2 对 LPS 诱导产生 ROS 的影响

阴性对照组细胞内含少量绿色荧光,说明 ROS 表达水平较低;而 LPS 能明显升高细胞内 ROS 浓度,经

100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 预处理 1 h 再加入 LPS, ROS 水平明显降低 (图 5)。



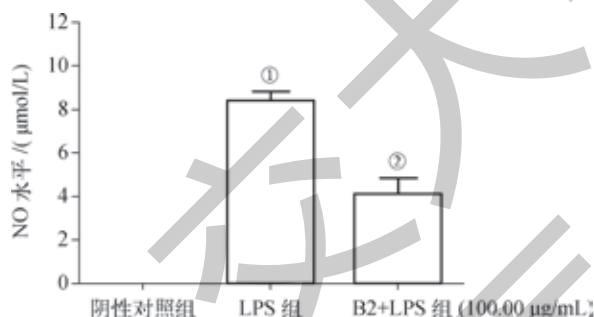
注: A. 阴性对照组; B. LPS 组; C. B2+LPS 组 (100.00 $\mu\text{g/mL}$)。

图 5 原花青素 B2 对 LPS 诱导 hPDLCs 产生 ROS 的影响

Fig 5 Effect of procyanidin B2 on ROS production in hPDLCs induced by LPS

2.6 原花青素 B2 对 LPS 诱导 hPDLCs 分泌 NO 的影响

阴性对照组培养上清液中未检测出 NO。LPS 刺激 hPDLCs 48 h 后,上清液中 NO 含量升至 $(8.398 \pm 0.421) \mu\text{mol/L}$;若经 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 预处理 1 h,上清液中 NO 含量下降至 $(4.120 \pm 0.738) \mu\text{mol/L}$,差异有统计学意义 ($P=0.002$) (图 6)。



注: ① $P=0.000$, 与阴性对照组比较; ② $P=0.002$, 与 LPS 组比较。

图 6 原花青素 B2 对 LPS 诱导 hPDLCs 分泌 NO 的影响

Fig 6 Effect of procyanidin B2 on NO secretion of hPDLCs induced by LPS

3 讨论

牙周炎是以牙周组织破坏为特点的慢性炎症性疾病,并已经成为加重全球非传染性慢性病负担的一个重要公共卫生问题^[12]。牙龈卟啉单胞菌等牙周致病菌在龈沟或牙周袋内定植,协同其代谢产物(如 LPS、胶原酶等)作用于牙周支持组织,一方面对其产生毒性作用,另一方面刺激免疫细胞及牙周组织细胞,引发宿主免疫反应,造成牙周局部代谢紊乱,从而导致牙周组织破坏^[13]。洁治、刮治等机械清洁以及抗生素应用,仅能清除菌斑和抑制细菌繁殖;而抗生素的过度使用易引起致病菌产生耐药性,并且具有一定的不良反应。现在国内外学者重点关注如何控制

免疫反应中产生的过量炎症介质对牙周组织的伤害,寻找具有抗炎、抗氧化、增强宿主免疫的辅助药物成为牙周炎治疗研究的新方向。

原花青素是人类膳食中最丰富的多酚类化合物。动物实验^[14]表明,口服原花青素可降低牙周炎大鼠局部炎症因子水平和血清中 ROS 水平,增强抗氧化水平。原花青素 B2 是原花青素中具有高度生物活性的成分,研究^[7-10]表明其具有抗菌、抗炎、抗肿瘤和增强免疫等生物学效应,但其对牙周组织的作用未见报道。

因此,本实验利用 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 hPDLCs 作为牙周组织炎症细胞模型,研究原花青素 B2 对 hPDLCs 炎症反应的影响。

生物安全性是药物应用于临床开发的必要条件。之前的研究发现原花青素 B2 具有较高的生物安全性。Shilpi 等^[15]实验表明原花青素 B2 对乳腺癌细胞 (MDA-MB231) 的半数致死浓度 (LC_{50}) 为 150 $\mu\text{mol/L}$,而该浓度对人角质细胞 (HaCat) 无毒性作用;Sung 等^[8]在研究原花青素 B2 对巨噬细胞 Raw264.7 的抗炎作用时,发现在 24 h 时间点,低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的原花青素 B2 对 Raw264.7 细胞不具有细胞毒性。我们的研究表明,实验浓度范围内的原花青素 B2 均未对 hPDLCs 产生毒性作用。100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 可增强细胞活性,而当其浓度达到 200.00 $\mu\text{g/mL}$ 时虽然对 hPDLCs 无毒性作用,但与 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 组相比,细胞活性开始减弱。

炎症过程中免疫细胞及牙周组织细胞产生的炎症因子影响了牙周炎的进展。IL-1 β 和 IL-6 是多效性促炎因子,与炎症密切相关,可促进破骨细胞的形成和骨吸收^[16];IL-1 β 和 IL-6 参与了慢性牙周炎不同临床阶段的免疫调节作用,慢性牙周炎患者龈沟液中 IL-1 β 和 IL-6 水平明显高于牙周健康者,而牙周炎活动期患者又高于静止

期患者^[17]。IL-8 是中性粒细胞趋化因子和激活剂, 也能诱导骨吸收; meta 分析^[18]表明, 与牙周健康者相比, 慢性牙周炎患者牙龈组织中 IL-8 mRNA 和蛋白表达水平显著升高。有研究^[8]表明, 原花青素 B2 可通过提高巨噬细胞 IL-1 受体相关激酶蛋白的表达, 显著抑制大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) LPS 诱导的 IL-1 β 和 IL-6 等炎症介质的产生。本实验以牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌的 LPS 为刺激源, 以 hPDLs 为实验对象, 结果发现原花青素 B2 能不同程度下调 IL-1 β 、IL-6、IL-8 的 mRNA 及蛋白的表达, 并随着原花青素 B2 浓度增加, 抑制作用越明显; 说明原花青素 B2 对 hPDLs 具有抑制炎症细胞因子的作用。

另外, 与氧化应激相关的炎症介质也是牙周炎的诱发因素。牙周发生炎症时, 中性粒细胞等产生大量 ROS 清

除细菌, 而过量的 ROS 会加重牙周组织损害。牙周炎的氧化应激表现为 ROS 浓度的升高, 抗氧化活性的抑制^[19]。NO 是研究较多的活性氧自由基, 免疫细胞和牙周组织细胞均可产生 NO, 过量的 NO 可以介导牙周炎症和牙槽骨丧失, 牙周炎患者唾液和血浆中 NO 浓度水平高于牙周健康者^[20]。原花青素 B2 是多羟基结构, 因此具有良好的抗氧化性。本研究发现 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 原花青素 B2 对炎症刺激下的 hPDLs 具有抑制 ROS 产生和减少 NO 分泌的作用。

综上所述, 原花青素 B2 生物安全性较好, 并能下调牙龈卟啉单胞菌 LPS 诱导的 hPDLs 炎症细胞因子的表达以及抑制 ROS 和 NO 的产生; 提示原花青素 B2 具有作为抗炎药物辅助治疗牙周炎的可能性。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] 孟焕新. 牙周病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 169-171.
- [2] Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri F, et al. Study of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal diseases: a systematic review and meta-analysis[J]. Med J Islam Repub Iran, 2017, 31: 62.
- [3] Gözl L, Memmert S, Rath-Deschner B, et al. LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: e986264.
- [4] Ben Lagha A, Dudonné S, Desjardins Y, et al. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) polyphenols target fusobacterium nucleatum and the host inflammatory response: potential innovative molecules for treating periodontal diseases[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(31): 6999-7008.
- [5] 张慧文, 张玉, 马超美. 原花青素的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(52): 296-304.
- [6] Fitzpatrick DF, Bing B, Maggi DA, et al. Vasodilating procyanidins derived from grape seeds[J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 957: 78-89.
- [7] Sutcliffe TC, Winter AN, Punessen NC, et al. Procyanidin B2 protects neurons from oxidative, nitrosative, and excitotoxic stress[J]. Antioxidants (Basel), 2017, 6(4): 77.
- [8] Sung NY, Yang MS, Song DS, et al. Procyanidin dimer B2-mediated IRAK-M induction negatively regulates TLR4 signaling in macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 438(1): 122-128.
- [9] Gopalakrishnan S, Ediga HH, Reddy SS, et al. Procyanidin-B2 enriched fraction of cinnamon acts as a proteasome inhibitor and anti-proliferative agent in human prostate cancer cells[J]. IUBMB Life, 2018, 70(5): 445-457.
- [10] Kopustinskiene DM, Savickas A, Vetchý D, et al. Direct effects of (–)-epicatechin and procyanidin B2 on the respiration of rat heart mitochondria[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 232836.
- [11] Schmuck J, Beckert S, Brandt S, et al. Extract from *Rumex acetosa* L. for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial *in vitro* adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by epicatechin-3-O-(4 β -8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-di-gallate)[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120130.
- [12] Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, et al. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression[J]. J Dent Res, 2014, 93(11): 1045-1053.
- [13] Silva N, Abusleme L, Bravo D, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases[J]. J Appl Oral Sci, 2015, 23 (3): 329-355.
- [14] Özden FO, Sakallioğlu EE, Sakallioğlu U, et al. Effects of grape seed extract on periodontal disease: an experimental study in rats[J]. Appl Oral Sci, 2017, 25 (2): 121-129.
- [15] Shilpi A, Parbin S, Sengupta D, et al. Mechanisms of DNA methyltransferase-inhibitor interactions: procyanidin B2 shows new promise for therapeutic intervention of cancer[J]. Chem Biol Interact, 2015, 233: 122-138.
- [16] Lagha AB, LeBel G, Greniercor D. Dual action of highbush blueberry proanthocyanidins on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and the host inflammatory response[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 10.
- [17] 莫丽妮, 林旭征. IL-1 β 、IL-6、IL-10 在慢性牙周炎不同临床阶段的免疫调节作用[J]. 包头医学院学报, 2017, 33(10): 39-41.
- [18] Finoti LS, Nepomuceno R, Pigossi SC, et al. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(22): e6932.
- [19] Di Meo S, Reed TT, Venditti P, et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1245049.
- [20] Parwani SR, Chitnis PJ, Parwani RN. Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease: a case-control and interventional study[J]. Int J Dent Hyg, 2012, 10(1): 67-73.

[收稿日期] 2018-09-10

[本文编辑] 瞿麟平